

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年4 月17 日 (17.04.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/030925 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/02, 47/48, A61L 27/22, 27/24, 27/34, C07K 7/06, 7/08, 14/00, 17/00, 17/06, A61P 9/00, 43/00 (74) 代理人: 谷川 英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro); 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/10278 (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (22) 国際出願日: 2002 年10 月2 日 (02.10.2002) (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (30) 優先権データ: 特願2001-306201 2001 年10 月2 日 (02.10.2001) JP 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 軒原 清史 (NOKIHARA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒616-8167 京都府京都市右京区太秦多藪町14-5 サンベール太秦629 Kyoto (JP). 濱田 吉之輔 (HAMADA, Yoshinosuke) [JP/JP]; 〒579-8057 大阪府東大阪市御幸町2-8 Osaka (JP). 松浦 成昭 (MATSUURA, Nariaki) [JP/JP]; 〒581-0032 大阪府八尾市弓削町2-2-1 Osaka (JP). 高橋 純造 (TAKAHASHI, Junzo) [JP/JP]; 〒567-0047 大阪府茨木市美穂ヶ丘19-D-714 Osaka (JP).

(54) Title: ANGIOGENESIS DRUGS

(54) 発明の名称: 血管新生剤

(57) Abstract: Novel angiogenesis drugs clinically applicable to treatment for humans and the like. These angiogenesis drugs comprise as the active ingredient peptides each having a specific amino acid sequence and an angiogenetic effect.

(57) 要約:

ヒトの治療等の臨床使用が可能な新規な血管新生剤が開示されている。本発明の血管新生剤は、所定のアミノ酸配列を有し、血管新生作用を有するペプチドを有効成分として含むものである。



WO 03/030925 A1

明細書

血管新生剤

技術分野

本発明は、血管を新生させる作用を有する血管新生剤に関する。本発明の血管
5 新生剤は虚血性疾患の治療のみならず人工骨等の生体代用材料を用いた臓器の再
生・修復にも有用である。

背景技術

現在日本人の死因として、心筋梗塞、脳梗塞など血管の閉塞に起因する虚血の
ためにおこる疾患がかなり多数を占めている。また、死因とならないまでも閉塞
10 性大動脈硬化症のように下肢の切断を余儀なくされ、QOL（生活の質）の損なわ
れる疾患も見られる。これらの虚血性疾患に対しては、新たに血管を形成するこ
とによる血管新生療法に大きな期待が寄せられている。血流が乏しいことによる
虚血性疾患の治療に加えて、血管新生は生体材料の生着にも重要な役割を果たし
15 ている。従来より、骨補填材またインプラント材として、アパタイトやチタン等
が用いられている。これらの従来の生体材料は、周囲の軟・硬組織との親和性が良
くないために本来の機能が十分発揮できない場合が多い。

周囲の軟・硬組織との親和性を良好にするために、生体接着機能性分子ペプチ
ドを用いることが提案されている。例えば、生体硬組織の組成・結晶性に類似し
た炭酸アパタイトと、生体接着機能性分子ペプチドの1つであるコラーゲンとを
20 混合した複合体を代用骨として用いることが提案されている（K. Nokihara et al.,
The Japanese Peptide Society, Osaka, 373-376, 2001., Development of
Biomimetic Materials: Novel Composite Material Carrying Immobilized Func
tional Peptides; M. Okazaki et al., Dentistry in Japan, 37, 95-100, 2001,
A New Concept of CO3 apatite-Collagen Composites with Adhesion Motif as
25 Biomaterials.）。この複合体は生体親和性が良好であり、バイオミメティック
な代用骨として有望である。

もし、このような生体材料表面、内面に血管が新生されれば、移植生体材料の
表面、内面の細胞へ術後早期に豊富な血液により栄養、酸素が十分に供給され、

細胞の機能を発揮するのに最適の環境が形成され、その結果、生体と良好な生着性が得られるため好都合である。

一方、副作用を含む安全性、代謝性等で大きな利点を有するペプチドはデザインが容易であり高効率な合成法や検定法が確立されている。加えてアミノ酸誘導体はコンビナトリアルケミカルライブラリー構築の都合よいビルディングユニットであり、固相合成法によって短時間で構造の最適化が可能である。従って、もし、血管新生作用を有する比較的分子量の小さいペプチドが存在すれば、これを合成し、単独投与あるいは生体材料に結合することにより、生体材料が接する周囲の軟・硬組織との相互作用をより良好にすることができ有利である。しかしながら、顕著な血管新生作用を有する低分子のペプチド、あるいはペプチドミメティックな有機化合物はほとんど知られていない。

発明の開示

従って、本発明の目的は、血管新生作用を有するペプチドを見出し、それを有効成分として含む、ヒトの治療等の臨床使用が可能な新規な血管新生剤を提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定のアミノ酸配列を有するペプチドが、血管新生作用を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列において、1 個～3 個のアミノ酸が置換し、若しくは一方若しくは両方の端部に位置する 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを含む血管新生剤を提供する。

本発明により、強い血管新生作用を有するペプチドが見出され、それを有効成分として含む新規な血管新生剤が初めて提供された。本発明の血管新生剤は、人工骨等の生体代用材料を用いた臓器の再生・修復や、生活習慣病として大きな部分を占める心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性大動脈硬化症などの虚血性疾患の治療にも有用である。

発明の実施の形態

下記実施例で具体的に示されるように、本願発明者らは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するヘプタペプチドが血管新生作用を有することを見出した。従って、本発明の血管新生剤の好ましい一例では、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するヘプタペプチドを有効成分として含む。

一般に、生理活性を有するペプチドにおいて、そのアミノ酸配列のうち、1 若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に 1 若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加された場合であっても、該生理活性が維持されることがあることは周知である。従って、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列において、1 個～3 個のアミノ酸が置換し、若しくは一方若しくは両方の端部に位置する 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチド（以下、便宜的に「修飾ペプチド」と呼ぶことがある）であって血管新生作用を有するペプチドも本発明の範囲に含まれる。なお、ここで、「修飾ペプチド」に含まれるアミノ酸は、天然のタンパク質を構成するアミノ酸に限定されるものではなく、天然のアミノ酸を化学修飾（例えば、アミノ酸の側鎖にニトロ基やハロゲンを導入する等）して得られるアミノ酸も包含される。また、D 型アミノ酸であってもよい。下記実施例で具体的に確認されたように、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の N 末端又は C 末端の 1 アミノ酸を欠失したアミノ酸配列を有するペプチドは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドと何ら遜色のない血管新生効果を発揮するものであり、本発明の好ましい形態である。下記実施例で具体的に記載するように、配列番号 1 の 4 番目のチロシンをアラニンに置換したペプチド（配列番号 8）では血管新生作用が失われたので、4 番目のチロシン残基は重要であると考えられ、その側鎖の化学構造が大幅に変更されるような置換はしない方が好ましい。もっとも、天然の L 型の Tyr でなくても D 型あるいはチロシンの側鎖のフェノールリングにハロゲンやニトロ基を入れたものなどが通常 Tyr の置換体としてメディシナルケミストリーで分子設計され、より強い効果や同等の効果を発揮する場合がしばしばあることが知られ

ている。また、側鎖に芳香環を有する他のアミノ酸（例えばフェニルアラニンなど）でも同等の効果を発揮するであろうと考えられ、下記実施例に具体的に記載するように、4番目のチロシンをフェニルアラニンで置換したペプチドは、より優れた効果を発揮することが確認された。従って、修飾ペプチドのうち、好ましいものとして、配列番号1に示すアミノ酸配列において、1個若しくは2個のアミノ酸が置換し、若しくは一方若しくは両方の端部に位置する1個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって、4番目のアミノ酸残基がチロシン残基又は側鎖に芳香環を有するアミノ酸、好ましくはフェニルアラニンである血管新生作用を有するペプチドを挙げることができる。なお、ここで、「側鎖に芳香環を有するアミノ酸」は必ずしも天然のタンパク質を構成するアミノ酸に限定されるものではなく、上記のようにチロシン又はフェニルアラニンの芳香環にニトロ基、ハロゲン、炭素数1～5のアルキル基及び炭素数1～5のアシル基から成る群より選ばれる少なくとも1種の置換基を結合させたチロシン又はフェニルアラニン誘導体も包含される。置換基が存在する場合、芳香環、好ましくはベンゼン環上に置換する置換基の数は、1～5個であり、1～3個が好ましい。また、「芳香環」は好ましくはベンゼン環又はベンゼン環を含むナフタレン環のような縮合環（複素環でもよい）であり、特に好ましくはベンゼン環である。

下記実施例に具体的に記載されるように、本願発明者らは、配列番号1の第4番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した、配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するペプチドが、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチドよりもさらに優れた血管新生効果を有することを見出した。なお、フェニルアラニンは、側鎖に芳香環（ベンゼン環）を有するアミノ酸である。したがって、本発明の好ましい形態として、配列表の配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列において、一方若しくは両方の端部に位置する1個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に位置する1個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであ

って血管新生作用を有するペプチドを含む血管新生剤を挙げることができる。

血管新生作用を有する領域は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中に含まれるので、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するペプチド又はその一部のアミノ酸が置換若しくはその端部領域が欠失した、血管新生作用を有する修飾ペプチドの一端又は両端に他の任意のアミノ酸配列が付加されていてもそのペプチドは血管新生作用を発揮し得る。このことは、フィブロネクチンやラミニン等の細胞接着性ペプチドの細胞接着作用がRGDという僅か 3 つのアミノ酸から成る領域や、YIGSRという僅か 5 つのアミノ酸から成る領域等により発揮されるものであることから類推できる。従って、血管新生活性を有する領域は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列中に含まれるので、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するペプチド又はその一部のアミノ酸が置換若しくはその端部領域が欠失した、血管新生作用を有する修飾ペプチドの一端又は両端に、長いアミノ酸配列が付加されている場合であっても、上記ペプチド又は修飾ペプチド領域が相互作用のために露出している限りは血管新生作用を発揮するものと考えられる。なお、現在では、人工ペプチドの立体構造は、その一次配列から、市販のコンピューターソフトを用いて容易に予測することができるので、サイズの大きなペプチドであっても、上記ペプチド又は修飾ペプチド領域が露出するペプチドは容易にデザインできる。

従って、本発明に用いられるペプチドのサイズの上限は何ら限定されるものではないが、あまりに大きいと製造が困難となり、取り扱いが不便であり、また、単位重量当たりの血管新生活性が減少すると考えられるので、ペプチドの総アミノ酸数は、通常、4～350、好ましくは4～50、さらに好ましくは5～20、さらに好ましくは5～10であり、さらに好ましくは6～10である。また、配列番号 1～7 及び 9～11 のいずれかに示すアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部にそれぞれ 10 個以下のアミノ酸が付加されたペプチドも好ましい。例えば、配列番号 12 及び 13 に示すアミノ酸配列は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のいずれか一端に他のアミノ酸配列を付加したペプチドであるが、いずれも優れた血管新生活性を有することが確認されている。なお、配列

番号 1 のみならず、配列番号 2 ～ 7 及び 9 ～ 11 に記載したアミノ酸配列を有するペプチドが血管新生作用を有することは下記実施例において具体的に確認されているので、これらはいずれも好ましい例である。

なお、ペプチドが血管新生作用を有するか否かは、下記実施例に具体的に示すように、ペプチド溶液を充填したマイクロセルをマウスの背部に埋め込み、埋め込んだ周囲の組織内の毛細血管の形成状況を観察することにより調べることができる。

上記ペプチドは、手動あるいは市販のペプチド合成機を用いる常法により容易に合成することができる。また、サイズの大きなペプチドは、常法により、遺伝子工学的に製造することができる。

上記ペプチドは、単独で、又は生理緩衝液中に溶解した注射液等の形態で、血管新生が望まれる組織に局所投与することができる。手術や外傷により生じた創傷等の近傍に本発明の血管新生剤を、注射や塗布、噴霧等の方法により局所投与することにより、血管新生が促進され、創傷の治癒が促進される。ここで、注射又は塗布若しくは噴霧等に用いるペプチド溶液中のペプチド濃度は、特に限定されないが、通常、 $1 \sim 10 \mu\text{g}$ (マイクログラム) / mL 程度である。また、投与量は、傷などの大きさや深さにより適宜選択できるが、傷全体がペプチド溶液で被覆される程度でよい。また、傷が治癒するまで、1 日～数日毎に 1 回～数回投与することができる。また、注射液には、他の消毒剤や消炎鎮痛剤など、通常、傷の治療薬に含まれる種々の成分を含んでいてもよい。

また、ペプチドをキャリアに結合し、ペプチドが結合されたキャリアを生体に埋め込むことにより血管新生を促進することもできる。これはキャリアに固定化している為に必要な部位に選択的に作用させることができ、新たな DDS (ドラッグデリバリーシステム) としての可能性に富んでいる。生体材料移植部に本発明の血管新生剤を、塗布、噴霧等の方法により局所投与することにより、血管新生が促進され、術後の治癒が促進される。ここで、キャリアとしては、特に限定されるものではなく、代用骨や代用歯、人工臓器等に用いられる樹脂や、タンパク質等の生体高分子を挙げることができる。樹脂に上記ペプチドを結合することに

より、該樹脂を生体に埋め込んだ際に、樹脂と接する周辺組織中での血管新生が促進され、樹脂の生体との親和性がより向上する。また、より好ましい態様として、タンパク質（本明細書において、特に断りがない限り「タンパク質」という語は、糖タンパク質やリンタンパク質等のタンパク質含有複合体を包含する）を

5 キャリアとして用いることができる。

ここで、キャリアとして用いるタンパク質は、生体適合性を有するいずれのタンパク質であってもよく、とりわけ、生体組織との接合を良好にするために、細胞接着性タンパク質であることが好ましい。細胞接着性タンパク質の好ましい例として、コラーゲン（ゼラチン）、フィブロネクチン、ビトロネクチン及びラミニ

10 ニン等並びにこれらの部分加水分解物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。なお、これらのタンパク質は、アレルゲンを除去した精製タンパク質であることが、アレルギー反応の防止の観点から好ましい。例えば、コラーゲンとしては、動物由来のコラーゲンが種々市販されているが、これらは純度が低く、アレルゲンが含まれており、品質の再現性も劣るので臨床用途に適用することは好ましくない。動物由来のコラーゲンを部分加水分解し、アレルゲンを

15 除去したゼラチンが臨床用途のために市販されているので、このような精製されたコラーゲン又はその部分加水分解物を用いることが好ましい。

キャリアに結合されるペプチドの量は、特に限定されず、適宜選択することができるが、通常、キャリアとペプチドの重量比率（キャリア：ペプチド）が100：1～1：1程度であり、好ましくは20：1～5：1程度である。

20

キャリアとペプチドとの結合は、共有結合によることが好ましい。結合は、例えばペプチドのN末端のアミノ基と、キャリア中の任意のアミノ基をグルタルアルデヒド等の結合架橋剤を用いて結合することにより容易に行うことができ、下記実施例に詳細な結合方法の一例が記載されている。また、人工臓器等の樹脂に

25 結合する場合には、この樹脂中に、アミノ基等の、ペプチドとの結合に用いることができる基を含むモノマーを共重合させておき、当該アミノ基等とペプチドのN末端のアミノ基を結合することができる。また、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチド又はその一部のアミノ酸が置換若しくは欠失した、血管

新生作用を有する修飾ペプチドの一端又は両端に、任意のアミノ酸配列を有する他のペプチドを結合したものを採用し、この任意のペプチドをキャリアとの結合に供することも好ましい。

ペプチドを結合したキャリアは、塗布又は噴霧する他にそのまま生体内に埋め込むことができる。キャリアとして、細胞接着性タンパク質を採用した場合には、ペプチド結合キャリアは、縫合糸、各種整形手術材料、傷口の癒着促進剤等として単独又は他の薬効成分とともに用いることができる。また、ペプチドを結合したキャリアタンパク質を、炭酸アパタイトや、本発明のペプチドを結合していない細胞接着性タンパク質等の他の材料と混合したものを代用骨等として用いることができる。この場合、代用骨等の最終の生体材料中に含まれるペプチドの量は、特に限定されないが、通常、生体材料 100 g 当たり、0.1mg~10 mg 程度である。

本発明に用いられるペプチドは、天然のタンパク質を構成するアミノ酸によって構成されているものであり、生体内ではペプチダーゼの作用を受けてやがてはアミノ酸に分解されるものであるので、安全性が高い。実際、下記実施例で行った、マウスを用いた *in vivo* の実験において、毒性は全く観察されなかった。このことは、薬効を発揮する使用量において、毒性が認められなかったことを示している。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。

実施例 1 ペプチドの合成

Fmoc 化学による高効率固相法 (K. Nokihara et al., *Innovation and Perspectives in Solid-Phase Synthesis* 1992, ed., R. Epton, Intercept Limited, Andover, UK, 445-448, 1992, Design and Applications of a Novel Simultaneous Multiple Solid-Phase Peptide Synthesizer; 軒原清史、有機合成化学協会誌、52, 347-358, 1994, 高効率ペプチド合成：多種品目同時自動合成とペプチドライブラリー) に基づき、ペプチド自動合成機を用いて配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するヘプタペプチド (AGP (angiogenic peptide の略) と命名)

を合成した。得られたペプチドを、液体クロマトグラフィー結合質量スペクトル (LCMS) システムで検定し、高純度であることを確認した (単一成分、質量理論値と一致)。

実施例 2 三次元培養された血管内皮培養組織中での血管新生作用

5 実施例 1 で合成した AGP の存在下でラットの血管内皮細胞を三次元培養した。この操作は具体的には次のようにして行った。細胞は transformed rat lung endothelial cells (TRLEC 細胞) を用いた。10 μ g/ml の濃度のペプチド溶液混和コラーゲン I 層中に TRLEC 細胞を播種し、14 日間の炭酸ガスインキュベーター中で培養した。コントロールは因子 (-) と従来より血管新生因子として知られて
10 いるタンパク質 VEGF (+) で行った。

14 日後に培養細胞を顕微鏡で観察したところ、コントロールはまったく管腔を形成しなかった。AGP と VEGF は管腔を形成し、この管腔を囲包する細胞同士が接着されていた。さらに、倍率 7000 倍で電子顕微鏡で管腔部分を観察したところ、管腔の内壁にマイクロビライ (微細細胞突起) が複数個形成されている
15 ことが認められた。さらに、倍率 15000 倍で、管腔を取り囲む血管内皮細胞同士の接合部分を観察したところ、内皮細胞同士が堅固に結合されている領域、すなわち、タイトジャンクション (密着結合) が認められた。これらの所見は内皮細胞が極性を獲得して、管腔を形成したことを示す。なお、極性というのは細胞が頭と尻尾のような機能分担する部分をもつ性質で、内皮細胞を通常培養して
20 いても極性はなく、したがって管腔も作らないので、このペプチドで誘導されたことを示している。管腔形成長さは有意に AGP の方が VEGF より優れていた。これらの結果から、AGP には血管内皮培養細胞から構成される組織中に、細胞同士を接着させてそれらの間に管腔を形成する作用 (生体内では、この管腔が血管になる) があることが確認された。

25 実施例 3、比較例 1 DAS アッセイによる in vivo での血管新生作用

細胞培養液として用いられる DMEM (ダルベッコ修飾イーグル培地) 中に 10 μ g/ml の濃度のペプチドを溶解した溶液を得た。直径 0.45 mm の円筒の上下を Millipore フィルター (商品名) で塞いで構成されるマイクロセルをマウスの背部に埋

め込んだ後、マイクロセル内に上記AGP等のペプチド溶液やVEGF溶液をインジェクションした。また、対照として、ペプチドを含まないリン酸緩衝液（PBS）単独もインジェクションした（比較例1）。5日後に、マイクロセル周辺の組織の様子を顕微鏡で観察した。

5 その結果、AGP 溶液をインジェクションしたマイクロセルに接していた組織では、枝分かれした毛細血管が多数形成されていた。一方、PBSのみを投与した比較例1（コントロール）では、このような毛細血管の生成は全く認められなかった。この結果をマグニチュードで示すと AGP では5（マグニチュード5を以下、「M5」のように表記する）、コントロールではM0、比較のために用いた既知
10 の血管新生タンパク質 VEGF ではM3であった。なお、マグニチュードは、スパイラル化した血管新生数であり、M0 が0本、M1 が1-10本、M2 が11-20本、M3 が21-30本、M4 が31-40本、M5 が41-50本、M6 が51本以上であることを示す。従って、マグニチュードMが大きいほど血管新生作用が大きい。上記結果から、AGP の in vivo における強い（顕著な）血管新生作用が確認された。

15 実施例4～9、比較例2

AGP を構成する7個のアミノ酸のうちの1個をアラニンに置換した、合計7種類のヘプタペプチド（配列番号2～8）を実施例1と同様に合成した。各ヘプタペプチドについて、実施例3に記載した DAS アッセイによりマウス体内における血管新生作用を調べた。

20 その結果、配列番号1の4番目のチロシンをアラニンに置換したペプチド（配列番号8、比較例2）では、比較例1と同様、スパイラル化した血管新生作用が全く認められなかったが、他のペプチド（配列番号2～7、実施例4～9）では、AGP と同等又はそれ以上の新生血管が形成されており、明らかな血管新生作用が認められた。血管新生能をマグニチュードMで表記すると、コントロール（ペプチドなし）（M0）、AGP（M5）、AGP1（M5）、AGP2（M3）、AGP3（M2）、AGP4（M0）、AGP5（M3）、AGP6（M4）、AGP7（M6）であった。なお、ここで、AGP1 は1位をAlaで置換したもの、以下同様で AGP7 は7位をAla 置換したものであり、括弧内は上記した血管新生マグニチュードを示す。上記結果から、AGP のうち、少なくともN末
25

端とC末端は、血管新生作用にとって必要ではないことが明らかになった。従って、AGPのN末端又はC末端を、キャリアとの結合部位として利用しても血管新生作用が損なわれないことが明らかになった。

実施例10 ペプチドのキャリアタンパク質への結合

5 キャリアタンパク質として、動物由来コラーゲンを部分加水分解し、アレルギーの部分を除いたゼラチンである FreAlagin AD タイプ（宮城化学工業株式会社製、分子量 2000～20000）を用いた。FreAlagin AD タイプは、臨床での使用が認められているものである。

10 FreAlagin AD（キャリアタンパク質）100 mg を 2.5 mL の MilliQ 水に溶解した。AGP 1.20～1.32 mg を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）1 mL に溶解し、キャリア蛋白質に氷冷下で加えた。グルタルアルデヒド（25%溶液を 0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）で 10 倍に希釈し、0.15 mL を得られた混合物に滴下（4℃）、反応混合物を 4℃で 3～4 時間攪拌した。これにより、AGP の N 末端のアミノ基と、キャリアタンパク質のアミノ基が共有結合された。

15 完全な結合の確認は薄層クロマトグラフィー（TLC）で原料消失にて行った。反応混合物は 5 %酢酸を溶出液とし G10 カラム（ファルマシア社製）で脱塩した。主ピークを凍結乾燥しほぼ定量的に結合物を得た。

実施例11 AGP 結合ゼラチンの三次元培養された血管内皮培養組織中での血管新生作用

20 実施例10で合成したAGP結合ゼラチンの存在下でラットの血管内皮細胞を三次元培養した。この操作は具体的には次のようにして行った。細胞はtransformed rat lung endothelial cells（TRLEC細胞）を用いた。ペプチドAGP結合ゼラチン（コンジュゲート）とコラーゲンタイプIを1：10の割合で混和し、10 μg（マイクログラム）/mlの濃度にしたコンジュゲート・コラーゲン混和溶液混和層中にTRLEC細胞を播種し、14日間の炭酸ガスインキュベーター中で培養した。コントロールは因子（-）で他は従来より血管新生因子として知られているタンパク質VEGF（+）を用いた。

14 日後に顕微鏡で観察したところ、コントロールはまったく管腔を形成しな

かった。AGP コンジュゲートと VEGF とは管腔を形成し、この管腔を囲包する細胞同士が接着されていた。さらに、倍率 7000 倍で電子顕微鏡で管腔部分を観察したところ、管腔の内壁にマイクロビライ（微細細胞突起）が複数個形成されていることが認められた。さらに、倍率 15000 倍で、管腔を取り囲む血管内皮細胞同士の接合部分を観察したところ、内皮細胞同士が堅固に結合されている領域、すなわち、タイトジャンクションが認められた。管腔形成長さは有意に AGP コンジュゲートの方が VEGF より優れていた。これらの結果から、AGP コンジュゲートには血管内皮培養細胞から構成される組織中に、細胞同士を接着させてそれらの間に管腔を形成する作用（生体内では、この管腔が血管になる）があることが確認された。

実施例 11、比較例 3 DASアッセイによる *in vivo*での血管新生作用

100 μ g/ml の濃度の AGP コンジュゲート（実施例 10 で作製）をコラーゲン I に 1 : 10 の割合で溶解し、10 μ g/ml の濃度のプチド結合ゼラチンコラーゲン混和溶液を得た。直径 0.45 mm の円筒の上下を Millipore フィルター（商品名）で塞いで構成されるマイクロセルをマウスの背部に埋め込んだ後、マイクロセル内に上記 AGP コンジュゲートと VEGF 溶液とをインジェクションした。また、対照として、ペプチドを含まないリン酸緩衝液（PBS）単独もインジェクションした（比較例 3）。5 日後に、マイクロセル周辺の組織の様子を顕微鏡で観察した。

その結果、AGP コンジュゲート・コラーゲン混和溶液をインジェクションしたマイクロセルに接していた組織では、スパイラル化した毛細血管が多数形成されていた。一方、PBS のみを投与した比較例 3 では、このようなスパイラル化した血管の形成は全く認められなかった。血管新生マグニチュードは、対照は M0、AGP は M5、VEGF は M3 であった。この結果から、AGP コンジュゲートの *in vivo* における血管新生作用が確認された。

実施例 12 ~ 21、比較例 4 ~ 7

配列番号 9 ないし 22 に示すアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、実施例 3 と同様にして DAS アッセイを行った。結果を下記表 1 に示す。

表 1

例	配列番号	配列	血管新生マグ ニチュード
実施例 1 2	9	S V V F G L R	M 6
実施例 1 3	1 0	S V V Y G L	M 5
実施例 1 4	1 1	V V Y G L R	M 5
実施例 1 5	1 2	S V V Y G L R G	M 4 - 5
実施例 1 6	1 3	G R G D S V V Y G L R	M 4 - 5
実施例 1 7	1 4	R G D S V V Y G	M 2 - 3
実施例 1 8	1 5	S V V y G L R (y = D Tyr)	M 2
実施例 1 9	1 6	S V V W G L R	M 3
実施例 2 0	1 7	S V V Y G	M 2
実施例 2 1	1 8	S V V Y	M 1
比較例 4	1 9	S V V	M 0
比較例 5	2 0	V Y G L R	M 0
比較例 6	2 1	Y G L R	M 0
比較例 7	2 2	G L R	M 0

注 実施例 1 8 (配列番号 1 5) の y は D アミノ酸で Tyr の D 体を意味する。

以上の結果から、配列番号 9 ~ 1 1 で示すアミノ酸配列を有するペプチドが非常に優れた血管新生活性を有し、とりわけ、配列番号 9 で示すアミノ酸配列を有するペプチドが特に優れた血管新生活性を有することが明らかになった。また、配列番号 1 で示すアミノ酸配列の N 末端又は C 末端に他のアミノ酸配列を有するペプチドも優れた血管新生活性を有することが明らかになった。

産業上の利用可能性

本発明の血管新生剤は、強い血管新生作用を有し、人工骨等の生体代用材料や人工臓器の体内埋め込み及び臓器の修復に有用である。また、生活習慣病として大きな部分を占める心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性大動脈硬化症などの虚血性疾患の治療にも有用である。

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列において、1 個～3 個のアミノ酸が置換し、若しくは一方若しくは両方の端部に位置する 1 個若しくは 2 個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを有効成分として含む血管新生剤。

2. 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列において、1 個若しくは 2 個のアミノ酸が置換し（ただし、4 番目のチロシン残基はチロシン残基又は側鎖に芳香環を有するアミノ酸である）、若しくは一方若しくは両方の端部に位置する 1 個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを含む請求項 1 記載の血管新生剤。

3. 前記側鎖に芳香環を有するアミノ酸が、フェニルアラニン又はそのベンゼン環に 1 又は複数の置換基を有する化学修飾フェニルアラニンである請求項 2 記載の血管新生剤。

4. 配列表の配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列において、一方若しくは両方の端部に位置する 1 個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に位置する 1 個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを含む請求項 1 記載の血管新生剤。

5. 配列表の配列番号 1 ないし 7 のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するペプチド又はこれらのアミノ酸配列のいずれかの一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを含む請求項 2 記載の血管新生剤。

6. 配列表の配列番号 9 ないし 11 のいずれかで示されるアミノ酸配列を有するペプチド又はこれらのアミノ酸配列のいずれかの一方若しくは両方の端部に他

のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを含む請求項2記載の血管新生剤。

7. 配列番号9で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又はこれらのアミノ酸配列のいずれかの一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって血管新生作用を有するペプチドを含む請求項6記載の血管新生剤。

8. 前記ペプチドの総アミノ酸残基数が4～350である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の血管新生剤。

9. 前記ペプチドの総アミノ酸残基数が4～50である請求項8記載の血管新生剤。

10. 前記ペプチドの総アミノ酸残基数が5～20である請求項9記載の血管新生剤。

11. 前記ペプチドは、配列表の配列番号1ないし7のいずれかで示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部にそれぞれ10個以下のアミノ酸が付加されたペプチドである請求項5記載の血管新生剤。

12. 前記ペプチドは、配列表の配列番号1ないし7のいずれかで示されるアミノ酸配列を有する請求項11記載の血管新生剤。

13. 前記ペプチドは、配列表の配列番号9ないし11のいずれかで示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部にそれぞれ10個以下のアミノ酸が付加されたペプチドである請求項12記載の血管新生剤。

14. 前記ペプチドは、配列表の配列番号9ないし11のいずれかで示されるアミノ酸配列を有する請求項13記載の血管新生剤。

15. キャリアに結合された形態にある請求項1ないし14のいずれか1項に記載の血管新生剤。

16. 前記キャリアがタンパク質である請求項15記載の血管新生剤。

17. 前記キャリアタンパク質が、細胞接着性タンパク質である請求項16記載の血管新生剤。

18. 前記細胞接着性タンパク質がコラーゲン又はその部分加水分解物である

請求項 17 記載の血管新生剤。

19. 血管新生が所望される患者の部位に請求項 1 ないし 18 のいずれか 1 項に記載の血管新生剤を投与することを含む、血管の新生方法。

20. 請求項 1 ないし 18 のいずれか 1 項に記載のペプチド又はキャリアに結合されたペプチドの血管新生剤製造のための使用。

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> NOKIHARA Kiyoshi et al.

<120> Agent for Angiogenesis

<130> 02PF249-PCT

<160> 22

<210> 1

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 1

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 2

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 2

Ala Val Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 3

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 3

Ser Ala Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 4

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 4

Ser Val Ala Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 5

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 5

Ser Val Val Tyr Ala Leu Arg

1

5

<210> 6

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 6

Ser Val Val Tyr Gly Ala Arg

1

5

<210> 7

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 7

Ser Val Val Tyr Gly Leu Ala

1

5

<210> 8

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide not having angiogenic activity

<400> 8

Ser Val Val Ala Gly Leu Arg

1

5

<210> 9

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 9

Ser Val Val Phe Gly Leu Arg

1

5

<210> 10

<211> 6

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 10

Ser Val Val Tyr Gly Leu

1

5

<210> 11

<211> 6

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 11

Val Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 12

<211> 8

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 12

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Gly

1

5

<210> 13

<211> 11

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 13

Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

10

<210> 14

<211> 8

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 14

Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly

1

5

<210> 15

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 15

Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 16

<211> 7

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 16

Ser Val Val Trp Gly Leu Arg

1

5

<210> 17

<211> 5

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 17

Ser Val Val Tyr Gly

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide having angiogenic activity

<400> 18

Ser Val Val Tyr

1

<210> 19

<211> 3

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide not having angiogenic activity

<400> 19

Ser Val Val

1

<210> 20

<211> 5

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide not having angiogenic activity

<400> 20

Val Tyr Gly Leu Arg

1

5

<210> 21

<211> 4

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide not having angiogenic activity

<400> 21

Tyr Gly Leu Arg

1

<210> 22

<211> 3

<212> Protein

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligopeptide not having angiogenic activity

<400> 22

Gly Leu Arg

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10278

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/02, 47/48, A61L27/22, 27/24, 27/34, C07K7/06,
7/08, 14/00, 17/00, 17/06, A61P9/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00-38/58, A61L15/00-33/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), REGISTRY(STN), WPI/L(QUESTEL), JOIS(JICST FILE),
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 99/08730 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORP.), 25 February, 1999 (25.02.99), Claim 19; page 7, lines 7 to 19 & AU 9887837 A & EP 1003570 A1 & JP 2002-500898 A	1, 2, 8, 9 15-18, 20
X Y	JP 2000-300263 A (Helix Research Institute), 31 October, 2000 (31.10.00), Claim 1; sequence 8 (Family: none)	1, 2 15-18, 20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 December, 2002 (11.12.02)

Date of mailing of the international search report
14 January, 2003 (14.01.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10278

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 91/05802 A1 (CREATIVE BIOMOLECULES, INC.), 02 May, 1991 (02.05.91), Page 5, line 27 to last line; page 9, lines 2 to 12; page 16, lines 24 to 30 & AU 9066481 A & CA 2027259 A & DE 69032424 E & EP 448704 A & JP 10-114673 A & JP 2001-095591 A & JP 04-502336 A & US 5171574 A & ES 2118723 T3	15-18, 20
A	WO 01/71358 A1 (GLAXO GROUP LTD.), 27 September, 2001 (27.09.01), Claim 6 & AU 200142569 A	1, 2, 8-12
A	WO 00/63236 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORP.), 26 October, 2000 (26.10.00), Claim 9 & AU 200043568 A & EP 1173469 A2 & BR 200009804 A & US 2002/0058336 A1	1, 2, 8-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10278

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 19 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: parts of 1-18 and 20

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10278

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

Claims 1 to 18 and 20

In parts of the inventions as set forth in the above claims, it is stated to use, as the active ingredient, a peptide having a specific amino acid sequence (hereinafter referred to as a "specific sequence") specified by, for example, "a peptide having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:-- in Sequence Listing by substitution of 1 to 3 amino acids, deletion of 1 or 2 amino acids located at one or both ends, or addition of other amino acid sequence(s) to one or both ends of the above amino acid sequence" and has a specific activity, i.e., an "angiogenetic activity" (see, "Remark 1" and "Remark 2" in the next page).

Although peptides having various sequences are involved in the scope of the peptide having a specific sequence as described above, the description discloses nothing but the activity is exhibited in cases of using peptides having the sequences of SEQ ID NOS:1 to 7 and 9 to 21 as shown in Examples. That is to say, nothing is declared concerning other cases such that a long chain amino acid is added to an end or 2 or 3 amino acids are substituted.

In page 3, lines 6 to 9 of the present application, the applicant states "it is well known that the physiological activity of a physiologically active peptide is generally sustained even though one or more amino acids in its amino acid sequence are substituted or deleted or one or more amino acids are inserted or added to the amino acid sequence". However, this general theory is seemingly applicable exclusively to physiologically active peptides having a certain chain length. In case of a peptide consisting of a small number of amino acids (as the one of the present application consisting of 7 amino acids), it is considered that the activity is largely affected by the substitution, deletion or addition of even a single amino acid. In fact, the test results of Comparative Example 5 indicate that a peptide having a specific sequence (SEQ ID NO:20) has no specific activity as described above. Thus, it is assumed that a peptide having the specific sequence as described above sustains the activity comparable to the original sequence only at a low possibility.

Even though the statement in the description of the present application and the common technical knowledge at the priority date of the present case are taken into consideration, a person skilled in the art can not anticipate peptides with what sequences have the above-described specific activity other than the peptides cited in Examples of the present application as having the specific activity. Thus, the scopes of the inventions as set forth in the above claims cannot be clearly understood. Accordingly, no meaningful search can be made on the parts of the inventions as set forth in these claims.

Among the inventions as set forth in the above claims, those having, as the active ingredient, the peptides cited in Examples of the present application as having the specific activity and the peptides having amino acid sequences derived from the above sequences by addition of other amino acid sequence(s) to one or both ends thereof were completely examined.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/10278

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

Remark 1:

Although it is understood that the expression "A, B or C" means one selected from among A, B and C, it is described in claim 4 that substitution and addition might be carried out at the same time in the sequence of SEQ ID NO:1 as set forth in claim 1. Thus, the meaning "or" is unclear. In this search, therefore, the term "or" is interpreted as "and/or".

Remark 2:

Although it is understood that the expression "a peptide having the amino acid sequence represented by Sequence A" means "a peptide comprising an amino acid sequence containing Sequence A", it is described in claim 1 and the description "a peptide having the amino acid sequence represented by Sequence A or a peptide having an amino acid sequence derived from this sequence by - - - addition of other amino acid sequence(s) to one or both ends of the above-described amino acid sequence". In this search, therefore, the term "having" is interpreted as "comprising".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K38/02, 47/48, A61L27/22, 27/24, 27/34, C07K7/06, 7/08, 14/00, 17/00, 17/06, A61P9/00, 43/00		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K38/00-38/58, A61L15/00-33/18		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1926-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2002年 日本国実用新案登録公報 1996-2002年 日本国登録実用新案公報 1994-2002年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), REGISTRY (STN), WPI/L (QUESTEL), JOIS (JICSTファイル), SwissProt/PIR/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	W099/08730 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 1999.02.25, Claim19, 第7頁第7行~第19行参照 & AU 9887837 A & EP 1003570 A1 & JP 2002-500898 A	1, 2, 8, 9 15-18, 20
X Y	JP 2000-300263 A (株式会社ヘリックス研究所) 2000.10.31, 請求項1, 配列8参照 (ファミリーなし)	1, 2 15-18, 20
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11.12.02	国際調査報告の発送日 14.01.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 岡崎 美穂 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 91/05802 A1 (CREATIVE BIOMOLECULES, INC.) 1991.05.02, 第5頁第27行～最下行、第9頁第2行～第12行、第16頁第24行～第30 行等参照 & AU 9066481 A & CA 2027259 A & DE 69032424 E & EP 448704 A & JP 10-114673 A & JP 2001-095591 A & JP 04-502336 A & US 5171574 A & ES 2118723 T3	15-18, 20
A	WO 01/71358 A1 (GLAXO GROUP LIMITED) 2001.09.27, Claim6参照 & AU 200142569 A	1, 2, 8-12
A	WO 00/63236 A2 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2000.10.26, Claim9参照 & AU 200043568 A & EP 1173469 A2 & BR 200009804 A & US 2002/0058336 A1	1, 2, 8-11

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲19は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 1~18, 20の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページ参照。)

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 の続き

・請求の範囲 1 ～ 18, 20

上記請求の範囲に係る発明の一部において、「配列表の配列番号～で示されるアミノ酸配列において、1個～3個のアミノ酸が置換し、若しくは一方若しくは両方の端部に位置する1個若しくは2個のアミノ酸が欠失し、若しくは前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチド」等の規定により特定された配列（以下、「特定配列」という）を有し、且つ「血管新生作用」という特定活性を有するペプチドを有効成分とすることが記載されている（次頁「注1」、「注2」参照）。

上記特定配列からなるペプチドには多種多様な配列からなるペプチドが包含され得るが、本願明細書においては、配列番号1～7, 9～21の配列からなるペプチドを用いた場合に活性を有することが実施例において示されているのみであり、その他の場合、例えば長鎖のアミノ酸が端部に付加した場合や、2あるいは3個のアミノ酸が置換した場合については何ら示されていない。

出願人は本願第3頁第6行～第9行において、「一般に、生理活性を有するペプチドにおいて、そのアミノ酸配列のうち、1若しくは複数のアミノ酸が置換し若しくは欠失し、若しくは該アミノ酸配列に1若しくは複数のアミノ酸が挿入され若しくは付加された場合であっても、該生理活性が維持されることがあることは周知である」と記載しているが、この一般論は、ある程度の鎖長を有する生理活性ペプチドに対してのみ成り立つものであると考えられ、本願のように7つという少数のアミノ酸からなるペプチドでは、1つでもアミノ酸を置換、欠失、あるいは付加した場合であっても、その活性は大きく影響を受ける可能性が高いと認められる。実際、比較例5には、上記特定配列からなるペプチド（配列番号20）が、上記特定活性を有さないことを示す試験結果が示されており、上記特定配列からなるペプチドであっても、元の配列からなるペプチドと同等の活性を維持している蓋然性は低いと考えられる。

したがって、本願の明細書の記載、及び、本願優先日当時の技術常識を考慮しても、本願の実施例において具体的に活性を有することが示されているペプチド以外について、どのような配列からなるペプチドが上記特定活性を有するかを当業者といえども判断することができず、上記請求の範囲に係る発明の範囲を明確に把握することができない。このため、上記請求の範囲に係る発明の一部について、有意義な調査を行うことができない。

なお、上記請求の範囲に記載された発明のうち、本願の実施例において具体的に活性を有することが示されているペプチド、及びそのアミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分とするものについては完全に調査を行った。

注1：「A若しくはB若しくはC」という記載では、AとBとCの中から択一的に選択することを意味するものと解されるが、請求項4では、請求項1の配列番号1を基準として、置換と付加が同時に行われ得ることが規定されているため、「若しくは」により意味される内容が不明確である。本調査では「若しくは」を「若しくは／及び」と解釈した。

注2：「配列Aで示されるアミノ酸配列を有するペプチド」は、「配列Aを含むアミノ酸配列からなるペプチド」を意味するものと解されるが、請求の範囲1における「配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するペプチド又は該配列において、（中略）前記アミノ酸配列の一方若しくは両方の端部に他のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有するペプチドであって」との記載、及び明細書の記載からみて、本調査では「有する」を「からなる」と解釈した。